

EFICACIA *IN VITRO* DEL EXTRACTO DE *Phytolacca bogotensis* K. y *Alnus acuminata* K. EN EL CONTROL *IN VITRO* DE LA GARRAPATA ADULTA *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

JAIRO ALEXANDER MORA RAMOS

**UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
TUNJA
2016**

**EFICACIA *IN VITRO* DEL EXTRACTO DE *Phytolacca bogotensis* K. y
Alnus acuminata K. EN EL CONTROL *IN VITRO* DE LA GARRAPATA
ADULTA *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

JAIRO ALEXANDER MORA RAMOS

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título
de:

Médico Veterinario Zootecnista

Director (a):

Msc. Carlos Eduardo Rodríguez Molano

**UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
TUNJA
2016**

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCION	7
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	9
3. JUSTIFICACIÓN.....	10
4. OBJETIVOS.....	12
4.1 Objetivo General.....	12
4.2 Objetivos Específicos	12
5. MARCO CONCEPTUAL.....	13
5.1 GENERALIDADES DE LA GARRAPATA <i>R. (B) microplus</i>	13
5.2 IMPORTANCIA CLÍNICA	14
5.3 TRATAMIENTO	16
5.3.1 Organofosforados.....	16
5.3.2 Piretroides	16
5.3.3 Los endectocidas.....	17
5.3.4 Amidinas.....	17
5.4 FITOTERAPIA EN LA PRODUCCION ANIMAL	19
5.5 USO DE LA FITOTERAPIA EN EL CONTROL DE LA GARRAPATA ...	20
5.5.1 <i>Phytolacca bogotensis</i> K.	21
5.5.2 <i>Alnus acuminata</i> K.....	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS	25
6.1 LOCALIZACIÓN	25
6.2 UNIDAD EXPERIMENTAL	25
6.3 DISEÑO EXPERIMENTAL	26
6.4 PROCEDIMIENTOS.....	27
6.4.1 Recolección de Plantas y Elaboración de Extractos.	27
6.4.2 Recolección de Garrapatas y Mantenimiento en Laboratorio.....	29
6.4.3 Identificación cualitativa de los metabolitos secundarios	30
6.4.4 Elaboración de diluciones.....	31
6.4.5 Prueba de eficacia en garrapatas adultas.....	31
7. RESULTADOS	34
7.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LOS EXTRACTOS.....	34
7.2 Pruebas cualitativas de los metabolitos secundarios	34
7.2.1 Prueba de saponinas.....	34
7.2.2 Prueba de Wagner	35
7.2.3 Reacción para cumarinas.....	36
7.2.4 Prueba de Shinoda	36
7.3 Eficacia ixodicida de la <i>Phytolacca bogotensis</i> (guaba).....	37
7.4 Eficacia ixodicida de la <i>Alnus acuminata</i> (Aliso)	39
7.5 Resultados de los grupos control	41

8. DISCUSIÓN	43
9. CONCLUSIONES	48
10. RECOMENDACIONES	49
11. BIBLIOGRAFÍA	50

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Cronología del ciclo evolutivo de la garrapata <i>R. B microplus</i> (Mc Ginley-Smith y Tsao, 2003)	13
Figura 2. <i>Phytolacca bogotensis</i> . Foto de Juárez y Novara, 1993	21
Figura 3. <i>Alnus acuminata</i> K	23
Figura 4. Elaboración de los extractos etanólicos	28
Figura 5. Extractos puros	28
Figura 6. Recolección de <i>R. B microplus</i>	29
Figura 7. Exposición a los extractos	29
Figura 8. Preparación de diluciones	31
Figura 9. Lectura de mortalidad	32
Figura 10. Análisis cualitativo de saponinas	35
Figura 11. Análisis cualitativo de alcaloides	35
Figura 12. Análisis cualitativo de cumarinas	36
Figura 13. Análisis cualitativo de flavonoides	36
Figura 14. Mortalidad observada con la <i>P. bogotensis</i>	37

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Características Físicas	34
Tabla 2. Presencia de metabolitos secundarios	34
Tabla 3. Análisis estadístico mortalidad con <i>P. bogotensis</i> y la dilución 1:2	38
Tabla 4. Análisis estadístico mortalidad con <i>P. bogotensis</i> y la dilución 2,5:10	38
Tabla 5. Porcentaje y eficacia de mortalidad de la <i>P. bogotensis</i> con relación al grupo control (etanol)	39
Tabla 6. Porcentaje y eficacia de mortalidad de la <i>P. bogotensis</i> con relación al grupo control (agua)	39
Tabla 7. Mortalidad observada con la <i>A. acuminata</i>	40
Tabla 8. Análisis estadístico mortalidad con <i>A. acuminata</i>	41
Tabla 9. Porcentaje y eficacia de mortalidad de la <i>A. acuminata</i> con relación al grupo control (etanol)	41
Tabla 10. Mortalidad de los grupos control	42
Tabla 11. Análisis estadístico de los grupos control.....	42

1. INTRODUCCION

El control tradicional de garrapatas mediante compuestos químicos, además de ser una estrategia relativamente costosa, conlleva riesgos de contaminación ambiental, puede propiciar inestabilidad enzoótica y favorecer el desarrollo de quimio-resistencia (Errecalde *et al.*, 2009). Por lo anterior, resulta necesario establecer métodos alternativos de control que combinen el empleo de sustancias químicas, la utilización de esquemas de inmunización, la utilización de razas por cruces más resistentes a la parasitación por garrapatas y un correcto manejo de la nutrición de los animales y de las praderas.

Cuando un acaricida es utilizado de manera intensiva ocasiona una fuerte presión de selección que elimina los individuos susceptibles y el acaricida se convierte en el agente de selección más importante. De hecho, el uso indiscriminado de ixodicidas ha contribuido al desarrollo de resistencia que corresponde a un proceso evolutivo que aparece por selección genética y que conduce a la ineficacia de los productos químicos (Araque *et al.*, 2014).

Adicionalmente, el uso exagerado de ixodicidas bajo un esquema de erradicación, genera mayor susceptibilidad a la anaplasmosis y probablemente la presencia de mayor número de cargas parasitarias cuando la población de garrapatas aumenta por cualquier razón. Así mismo, el desarrollo de la resistencia a los ixodicidas aumenta los costos requeridos para el control de las garrapatas, bien sea porque exige la asociación de productos o bien porque se deben utilizar dosis mayores. El método de control tradicional mediante el uso de acaricidas químicos como es el caso de la ivermectina aunque ha sido exitoso, presenta serios problemas de contaminación en la carne y la leche (Polanco *et al.*, 2016).

Lo anterior, determinó la necesidad de buscar alternativas tales como el desarrollo de vacunas recombinantes, que han demostrado mayor efectividad en el control de estos parásitos. Así mismo, se ha optado por el empleo de extractos naturales

en la lucha integral contra las garrapatas porque brinda un control efectivo y duradero, reduce el empleo de acaricidas sintéticos comerciales y por consiguiente, disminuye el gasto invertido en ellos, al tiempo que prolonga la vida útil de los compuestos acaricidas. Además de restringir el volumen de residuos químicos que se vierten al medio y reducir la resistencia que la población de garrapatas presenta a los diferentes productos de origen químico; también reduce las pérdidas económicas por muerte del animal y los costos por tratamiento (Pulido- Herrera *et al.*, 2015).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En regiones tropicales y subtropicales, *R. (B) microplus* es la garrapata más importante que afecta al ganado vacuno y, por ello, su presencia se ha convertido en un problema para el sector ganadero en dos aspectos.

El primer ámbito es el económico, en el cual la capacidad de este parásito para producir daño, afecta al ganado provocando anemia, inapetencia y hasta la muerte. Además, el daño aumenta al convertirse en un vector de agentes patógenos como *Babesia sp.* y *Anaplasma sp.* El segundo, en materia comercial, la aparición y reproducción de esta garrapata trae como consecuencia indirecta la disminución en la producción de carne y leche; lo que conlleva a pérdidas económicas alrededor de los 500 billones de dólares al año (Grisi *et al.*, 2002).

Con el fin de controlar de alguna manera este problema, los ganaderos han utilizado baños periódicos con productos químicos. Sin embargo, esta práctica conlleva contaminación ambiental, presencia de residuos en carnes y leches y, actualmente, la resistencia de las garrapatas al efecto tóxico de las sustancias químicas se ha aumentado (Treviño, 2013).

Ante esta situación, se han investigado en distintas partes del mundo diferentes opciones para el control de las garrapatas, por medio de las cuales se logró demostrar la acción biocida o biostática, con una serie de agentes controladores, entre otros, los entomopatógenos, los cuales presentan una enorme posibilidad para el manejo integrado y el uso de extractos vegetales (Ojeda-Chi *et al.*, 2010; Rosado-Aguilar *et al.*, 2010).

3. JUSTIFICACIÓN

Las pérdidas anuales en América Latina por la presencia de garrapatas, se estiman alrededor de \$220.000.000 USD (FAO Animal Production and Health Paper N 36). Por cada 1.400 garrapatas adultas por año, la FAO, estableció la pérdida de un kilogramo de carne por animal. Adicionalmente, estudios de la dinámica poblacional indican que un bovino mantiene de 25.000 a 95.000 garrapatas por año con una media de 55.000, que dividido dentro de 1400 resulta es una pérdida de 18 a 68 Kg de carne por animal (Yáñez, 2013).

De forma global, se estima que 80% del ganado bovino del mundo está infestado con garrapatas. De hecho, hay regiones del mundo donde la industria ganadera no ha podido establecerse debido al problema de las garrapatas y las enfermedades asociadas (Marmanillo, 2015).

A cualquier nivel pecuario, el uso de plantas y sus extractos es una gran alternativa para el control de garrapatas, además de constituir un menor costo frente a los productos comerciales existentes actualmente. La medicina verde (productos preparados a partir de plantas medicinales), a pesar de ser muy antigua, se ha transmitido de generación en generación, y por ello sigue vigente en varios países del mundo. La utilización de plantas medicinales en el control de los ectoparásitos puede ser útil en la implementación de nuevas formas de producción limpia que permitan de manera integral y preventiva, participar en los procesos productivos y en el uso de materias primas e insumos, promoviendo la producción de alimento de origen animal, inocuos (Poaquiza y Ángel, 2012).

Ajustando los sistemas productivos hacia una producción más limpia, se logrará entrar a una apertura económica y por ende a los mercados internacionales, que exigen al ganadero producir carne y leche en óptimas condiciones de inocuidad, para consumidores que valoran atributos de calidad relacionados con el origen, pagan un precio diferencial por los productos fiables para su salud.

El presente trabajo se basa en lograr demostrar que la *P. bogotensis* K. y *A. acuminata* K. tienen efecto ixodicida en el control de la garrapata adulta del género *R. (B) microplus* y dar una alternativa de control natural.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Determinar la eficacia in vitro del extracto de *P. bogotensis* K. y *A. acuminata* K. en el control de la garrapata del genero *R. (B) microplus*

4.2 Objetivos Específicos

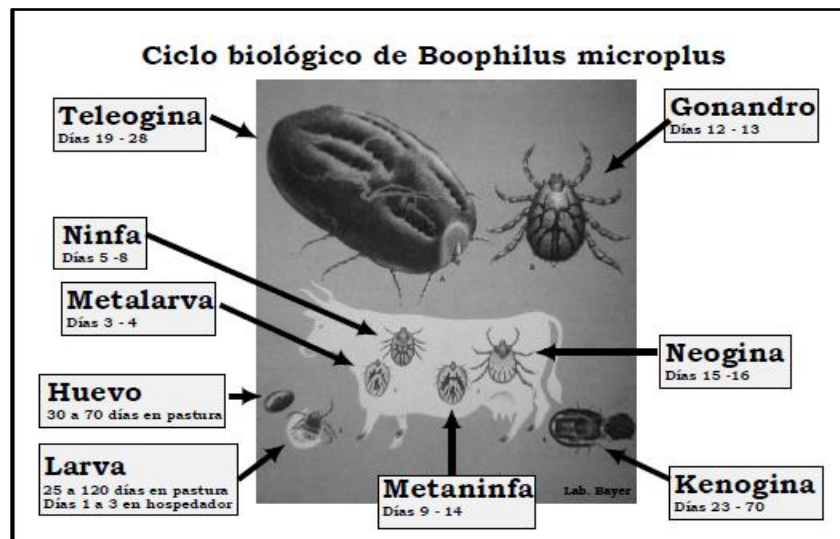
- Determinar la acción ixodicida in vitro de *P. bogotensis* K. en el control, in vitro de la garrapata adulta *R. (B) microplus*.
- Determinar la acción ixodicida in vitro de *A. acuminata* K. en el control, in vitro de la garrapata adulta *R. (B) microplus*.
- Identificar los metabolitos secundarios presentes en la *P. bogotensis* K. y *A. acuminata* K.

5. MARCO CONCEPTUAL

5.1 GENERALIDADES DE LA GARRAPATA *R. (B) microplus*

La garrapata de la especie *R.(B) microplus* presenta un ciclo de vida que se caracteriza por la utilización de un solo hospedero, esto es, que la fase parasítica (larva, ninfa y adulta) ocurre sobre el mismo hospedero en el que se alimenta, muda a ninfa y posteriormente a adulta. Los machos y las hembras copulan, y la hembra queda grávida para desprenderse y caer al suelo e iniciar la fase no parasítica y de encuentro. En general, esta etapa del ciclo biológico de *R.(B) microplus* dura aproximadamente de 19 a 21 días en condiciones óptimas. Una garrapata succiona de 0,5 a 3 ml de sangre durante su vida parasitaria y pone de 2.500-3.500 huevos (Figura 1) (Izquierdo, 2015).

Figura 1. Cronología del ciclo evolutivo de la garrapata *R. B microplus* (Mc Ginley-Smith y Tsao, 2003)



El microclima influye directamente en la reproducción y supervivencia de las garrapatas siendo la temperatura comprendida entre 27-39 °C y humedad relativa de 60-80% las más propicias para su desarrollo (Rodríguez *et al.*, 2006).

5.2 IMPORTANCIA CLÍNICA

Los efectos de las garrapatas en la salud humana y animal son múltiples. En la ganadería, la babesiosis y la anaplasmosis son dos patologías de alto impacto en términos de morbilidad y mortalidad siendo las garrapatas, En la transmisión de *Anaplasma marginale* (Benavides, 1985), también intervienen otros vectores como moscas hematófagas, también mediante agujas y material quirúrgico contaminado (UNIVEP, 1998; Veterinaria México, 2000).

La babesiosis bovina es una infección parasitaria transmitida por garrapatas que causa significativa morbilidad y mortalidad en el ganado bovino, y se identifica como la enfermedad transmitida por artrópodos más importante del mundo. Las especies más prevalentes, *Babesia bovis* y *B. bigemina*, se encuentran en las regiones tropicales y subtropicales; la incubación de la *B. bigemina* es de 12-14 días y de la *B. bovis* es de 6 -8 días; la infección se produce por la picadura de las garrapatas o por inoculación parenteral de sangre, se multiplica en los vasos periféricos y produce hemólisis, generando una anoxia anémica, produciendo en algunos casos la muerte. Los animales que sobreviven son portadores. Los síntomas son muy variables, se presenta debilidad, inapetencia, sed, anemia aguda, ictericia, hipertermia (40- 42°C), hemoglobinuria, anemia hemolítica, cese de rumia, constipación o diarrea (diarrea en arco), convulsiones, incoordinación con parálisis, excitación, sialorrea y coma (*B. bovis*), depresión, disminución producción y abortos (Urquarth, 1993).

Por su parte la anaplasmosis es causada por *Anaplasma marginale*, se encuentra en Sudáfrica, Australia, Asia, América del Sur y EE.UU. Se origina siempre por la sangre de un animal infectado, son susceptibles los bovinos adultos, los animales menores de 9 meses no desarrollan la enfermedad (Medellín, J. 2002).

Después de la entrada del agente al torrente circulatorio, sigue un periodo de incubación variable entre 15 y 45 días, aunque puede ser más largo;

posteriormente el parásito se multiplica y alcanza el máximo de la parasitemia entre 8 y 13 días. Los eritrocitos parasitados son removidos rápidamente de la circulación por los macrófagos del sistema fagocítico mononuclear, la anemia se desarrolla por la destrucción de los eritrocitos parasitados debido a factores inmunológicos creados después de la infección. La destrucción endotelial resulta de la disminución de las cifras de hematocrito y eritrocitos con la presencia de glóbulos rojos y un subsecuente daño tisular de los órganos y una pérdida de sangre en estos espacios. La enfermedad se caracteriza por hipertermia, palidez de las mucosas, ictericia, aborto y muerte; en los casos más graves se observan síntomas nerviosos por anoxia cerebral y tendencia al decúbito, la orina puede ser oscura debido a los pigmentos biliares, pero no se observa hemoglobinuria, en vacas en lactancia se registra un marcado descenso de la producción láctea que junto a la disminución del apetito son generalmente las primeras manifestaciones que se observan (Cordero *et al.*, 1993).

Fuera de lo ya mencionado, las garrapatas siendo parásitos hematófagos producen daños en la piel del animal y de los perjuicios económicos causados por los gastos en insumos y mano de obra necesaria para el control del parásito, la garrapata es la responsable de transmitir enfermedades como lo son la babesiosis y la anaplasmosis (Rodríguez *et al.*, 2006).

Además, es el ectoparásito más dañino para el ganado bovino en América Latina, Australia y parte de África. Por un lado, cada garrapata que consume sangre causa estrés y debilitación del animal afectado. A partir de unas 20-30 garrapatas por animal, el daño empieza a tener efectos económicos (merma del aumento de peso o de la producción de leche, posible efecto negativo sobre la fertilidad, debilitamiento que favorece otras enfermedades, etc.) (Rodríguez *et al.*, 2006). Se ha calculado que una infestación de 50 o más hembras repletas o teleóginas causan una reducción anual del aumento de peso de cerca de 500 gramos por garrapata. En ganado lechero la reducción de la producción láctea anual de un animal puede ser de 200 litros o más (Navarrete, 1999).

La FAO menciona que las pérdidas económicas atribuidas a *R. (B) microplus* por disminución de la ganancia de peso se han estimado en 7,3 US dólares/animal/año. Asimismo, las garrapatas producen bajas en la fertilidad, mayor tiempo en la engorda y dificultan la importación de razas mejoradas para incrementar la calidad genética en áreas infestadas (Junquera, 2011).

5.3 TRATAMIENTO

En el contexto del desarrollo industrial de los plaguicidas se produce una alta cantidad de ixodicidas de uso pecuario dentro de los que se destacan los compuestos organofosforados, carbamatos, piretroides y los endectocidas, así como fármacos como el amitraz y el fipronil. Todos ellos eficaces, pero con riesgo relativo de inducir efectos adversos en los animales tratados y de contaminar el ecosistema, así como de dejar residuos en carne y leche (Domínguez *et al.*, 2016).

5.3.1 Organofosforados

Los organofosforados fueron desarrollados en el año de 1950. La principal acción de los organofosforados sobre las garrapatas es la inhibición de la acetilcolinesterasa, que aumenta la concentración de acetilcolina y produce una alteración de la transmisión neuromuscular y con ello parálisis excitatoria del parásito (Adams, 2003). En la actualidad existen varios productos comerciales en diferentes presentaciones; spot-on, baño para inmersión, líquidos emulsionables, aspersión, orejeras y collares (Rivas, 2016).

5.3.2 Piretroides

Los piretroides se desarrollaron en la década de los setenta, son compuestos liposolubles que se absorben por vía dérmica y oral, de acción rápida sobre el parásito; el mecanismo de acción de los piretroides del grupo I consiste en aumentar la permeabilidad de la membrana a los iones de Na^+ , causando una corriente interna de Na^+ , seguida de un aumento en la permeabilidad del K^+ causando una corriente externa del K^+ ; lo que trae como consecuencia un decrecimiento del pico de conductancia del Na , una prolongación de la inactividad

de la conductancia del Na^+ y una reducción de la conductancia del K^+ ; produciendo la parálisis excitatoria de los insectos. Los piretroides tienen un amplio espectro de acción: solo, se utilizan contra garrapatas, ácaros de la sarna, moscas, pulgas y contra los insectos adultos en general. De forma similar al grupo anterior, se utilizan en forma de baños de aspersión e inmersión, en pour-on y en orejeras. Para perros y gatos, los piretroides se emplean contra pulgas, piojos, garrapatas y ácaros en jabones, champús y aerosoles, en collares y spot-on (Sumano, 2006).

5.3.3 Los endectocidas

Los endectocidas son antiparasitarios que pertenecen al grupo de las lactonas macrocíclicas, derivadas de productos naturales obtenidos por fermentación de organismos del suelo del género *Streptomyces*. Su mecanismo de acción se manifiesta al estimular la liberación de ácido gammaaminobutírico (GABA) del parásito, lo que provoca la parálisis e incluso la muerte del parásito. Los endectocidas tienen acción sistémica (actúan a través de la sangre del hospedador). La denominación *endectocida* deriva del hecho que, además de controlar muchos ectoparásitos, también son altamente eficaces contra nematodos. El posible efecto en salud pública se debe a la persistencia del compuesto en productos de origen animal como leche y carne con un periodo de retiro de 42 días en carne y 4 días leche. Las presentaciones que existen son: inyectables, pour-on de vertido dorsal listo para el uso, suspensiones orales, spot-on y tabletas para mascotas; las vías de administración son: s vía oral, dérmica y subcutánea (Sumano 2006).

5.3.4 Amidinas

Las amidinas son una clase de sustancias activas ectoparasiticidas con actividad de contacto principalmente contra garrapatas, ácaros y piojos. Su actividad insecticida-acaricida se descubrió en los años sesenta. La principal sustancia es el amitraz que se sigue usando abundantemente en la ganadería contra parásitos externos del ganado bovino, ovino, porcino y aviar, y de los perros. El mecanismo

de acción se basa en el bloqueo de los receptores de la octopamina en el cerebro de los parásitos: provocan híper- excitabilidad y seguidamente parálisis y muerte. La excitación hace también que las garrapatas no logren fijarse al hospedador para alimentarse. También poseen cierto efecto repelente lo que hace que muchas garrapatas se desprendan del hospedador antes de morir. Actúan sobre los parásitos externos fundamentalmente por contacto. Las amidinas están disponibles como concentradas para baños de inmersión, aspersión, pour-on de vertido directo. Para perros, el amitraz también está disponible en spot-on y en collares (Lorenzo *et al*, 2004).

En las alternativas de tratamiento de control biológico se tiene el uso del hongo *Lecanicillium lecanii* (Zare y Gams, 2004), el cual tiene amplia distribución mundial y un gran espectro como agente potencial en control biológico de diferentes hospederos como reptiles, coleópteros, dípteros, colémbolos y garrapatas; por esta razón, ha sido estudiado como posible agente antiparasitario. Según Pucheta Diaz *et al.*, (2006), los hongos entomopatógenos tienen un gran potencial como agentes controladores, constituyendo un grupo con más de 750 especies, diseminados en el medio ambiente y provocando infecciones fungosas a poblaciones de artrópodos, acros e insectos; además el uso de cepas de hongos, como: *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* actúan sobre la inhibición de oviposición, eclosión y potencial reproductivo de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Rubalcaba *et al.*, 2011).

Quesada *et al.*, (2006), evaluaron a *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *Verticillium lecanii* sobre teleoginas de *R. (B) microplus*, donde *M. anisoplie* generó inhibición del 87% a concentración de 10^9 conidiosporas x ml⁻¹. Posada y Lecuona (2009), evaluaron la efectividad de 259 aislados de *B. bassiana* obtenidos del suelo, de garrapatas muertas y de colección fúngica para el control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* hallando que la CL₅₀ para 98 de los aislados más virulentos fue de 1×10^7 y $1,15 \times 10^7$ conidias x ml⁻¹.

Otro recurso disponible en el mercado para el control de las garrapatas es el uso de la vacuna que es un antígeno poliprotéico puro, que genera la producción de anticuerpos en el ganado bovino.

La vacuna anti - garrapatas es diseñada con una proteína intestinal (antígeno) de la garrapata *B. microplus*; que al ser inoculada al ganado conduce a la creación de anticuerpos por parte de los bovinos y a una respuesta inmune contra el parásito. Actualmente existen dos vacunas disponibles comercialmente y recomendadas como ayuda al control de las garrapatas se trata de Tick Gard TM (Australia) y Gavac TM (Cuba) (Fernández *et al.*, 2005).

Su control se refleja inicialmente en la muerte de garrapatas adultas, pero más eficazmente en la disminución de la postura de huevos de las garrapatas sobrevivientes, al igual que la gran baja en la viabilidad de esos huevos (Betancourt, 2005).

La utilización de la vacuna ha alcanzado controles superiores al 65%, con lo que se ha logrado reducir el número de baños garrapaticidas requeridos durante el año. (Drugueri, 2004).

5.4 FITOTERAPIA EN LA PRODUCCIÓN ANIMAL

La fitoterapia, que corresponde al uso medicinal de las plantas, nunca ha dejado de tener vigencia. Muchas de las especies vegetales utilizadas por sus virtudes curativas entre los antiguos egipcios, griegos y romanos, pasaron a formar parte de la farmacopea medieval, que más tarde se vio enriquecida por el aporte de los conocimientos del Nuevo Mundo. Dichas plantas medicinales y los remedios que entonces se utilizaban se siguen usando hoy en día (Domínguez, 2008).

El empleo de plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se ha utilizado desde tiempo inmemorial. Durante mucho tiempo los remedios naturales, y sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal e incluso el único recurso

que disponían los médicos. Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y ampliar su experiencia en el empleo de los principios activos que de ellas se extrae (López, 2016).

5.5 USO DE LA FITOTERAPIA EN EL CONTROL DE LA GARRAPATA

En los últimos años se vienen impulsando estudios vinculados al uso de principios activos en las plantas y fitoterápicos que tienen potencialidades como garrapaticidas e insecticidas. Según Mamallacta y Azucena (2013), muchas plantas acumulan sustancias orgánicas que pueden ser extraídas en cantidades suficiente para ser económicamente utilizadas para las más variadas aplicaciones científicas, tecnológicas y comerciales. Los químicos extraídos de las plantas son normalmente clasificados en metabolitos primarios y secundarios. Las proteínas y ácidos nucleicos son generalmente excluidos de esta clasificación. Los metabolitos primarios son sustancias ampliamente distribuidas en la naturaleza ocurriendo de una forma u otra en prácticamente todos los organismos.

En las plantas superiores tales compuestos se concentran frecuentemente en semillas y órganos de almacenamiento que son necesarias para el desarrollo fisiológico, ya que poseen papel importante en el metabolismo celular básico. Ellos son usados principalmente como materia prima industrial, alimento o aditivo alimenticios e incluye productos tales como: aceites vegetales, ácidos grasos y carbohidratos (Martins y González, 2007).

Diferentes plantas han sido estudiadas con efectos en el control de estos ectoparásitos, entre ellos las hojas y semillas de Neem (*Azadirachta indica*), hojas de diferentes especies de Eucalyptus (Myrtaceae); aceites obtenidos de estas especies y extractos de otras como *Anadenanther amacrocarpa*, *Mormodica charantia* y *Artemisia annua* (Duarte, 2014; Srivastava, *et al.*, 2008; Garcia, 2011), las cuales muestran actividad ixodocida ante esta especie de garrapata. Otros reportes de especies como el “Rustico” *Monnina phytolacaefolia* H.B.K. (Polygalaceae) y el Tabaco *Nicotiana tabacum* con efectos acaricidas

representados en mortalidad larvaria y reducción de eficiencia reproductiva. Así mismo existen reportes de la acción acaricida de las semillas de *Annona muricata* L. (Annonaceae), las flores de *Syzygium malaccensis* (Myrtaceae) y las semillas de *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) (Soares *et al.*, 2010).

Los compuestos químicos derivados de plantas se presentan como una alternativa a los productos de síntesis química, ya que tienen baja toxicidad, son solubles en agua y se degradan mejor en el ambiente, por radiación solar y humedad. Estas propiedades permiten reducir el desarrollo de resistencia acaricida y el alto impacto ecológico en los sistemas ambientales.

5.5.1 *Phytolacca bogotensis* K.

Hierba de hojas simples, alternas, pecioladas o sésiles, estípulas ausentes o si presentes muy pequeñas, láminas de bordes enteros. Inflorescencias axilares o terminales, dispuestas en racimos simples o compuestos o en espigas, con brácteas y bractéolas. Flores perfectas o imperfectas; perigonio, con piezas libres o a veces unidas, persistentes en el fruto (Figura 2) (Juárez y Novara, 1993).



Figura 2. *Phytolacca bogotensis*. Foto de Juárez y Novara, 1993

La *Phytolacca bogotensis* es una planta herbácea presente en los andes colombianos en alturas que oscilan entre los 2000 y 4000 msnm. La planta contiene saponinas, una sustancia tóxica, la phytolascina, ácido phytolaccico, potasio y aceite de mostaza. Los frutos son muy jugosos y altamente tóxicos. Las hojas también son tóxicas. Habita en lugares húmedos, no muy sombríos. En recuperación de tierras degradadas, es una especie ideal por su abundante producción de biomasa y manejo bajo podas.

Su clasificación botánica se muestra a continuación:

Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Caryophyllales
Familia	Phytolaccaceae
Género	Phytolacca
Especie	Phytolacca bogotensis

Tradicionalmente ha sido usada para el tratamiento de neoplasias y desórdenes inflamatorios secundarios a patologías de características infecciosas como mastitis, parotiditis y faringitis, entre otros. Se han identificado algunos metabolitos secundarios tales como saponinas, alcaloides, flavonoides y taninos (Pombo *et al.*, 2014).

5.5.2 *Alnus alcuminata* K.

Las especies del género *Alnus* se consideran de gran importancia porque la raíz se asocia simbióticamente con Actinomycetes, formando nódulos fijadores de nitrógeno atmosférico, siendo este el principal mecanismo para la incorporación de nitrógeno reducido en suelos pobres (Burns y Hardy, 1975; Torrey, 1976; Normand y Lalonde, 1982) (Figura 3).



Figura 3. *Alnus acuminata* K

En Colombia el Aliso (*A. acuminata* K.), se encuentra ampliamente distribuido y se ha iniciado su utilización en proyectos de reforestación (Cáceres y Oyola, 1981). La madera es empleada como carbón vegetal y para la fabricación de cajas, cajones, palillos y postes (Sicco *et al.*, 1965), también es importante por el contenido de tanino (Torres, 1983).

Su clasificación botánica se muestra a continuación:

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Hamamelididae
Orden	Fagales
Familia	Betulaceae
Género	<i>Alnus</i>
Especie	<i>acuminata</i>

Los taninos contenidos en la corteza poseen propiedades astringentes (antidiarréico, hemostático local). Además, produce un efecto colerético. La corteza del Aliso se usa popularmente como antipirético; las hojas como analgésico local, para contener las diarreas y en la disquinesia hepatobiliar.

En uso externo se aplica en estomatitis, parodontopatías, faringitis, vulvovaginitis, heridas, ulceraciones cutáneas con contaminación estreptocócica, inflamaciones osteoarticulares, mialgias y contracturas musculares.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo fue de tipo experimental *in vitro* teniendo en cuenta la manipulación de algunas variables.

6.1 LOCALIZACIÓN

El trabajo se realizó con garrapatas obtenidas de bovinos parasitados naturalmente, ubicados en el municipio de Nuevo Colón-Boyacá que pertenece a la provincia de Márquez, su cabecera está localizada a los 05° 21' 30" de latitud norte y 73° 27' 38" longitud oeste, a una altura sobre el nivel del mar de 2.500 metros; tienen una temperatura media de 16°C. Está a una distancia de 34 Kilómetros de Tunja y de Santafé de Bogotá a 120 Kilómetros; tiene una población de 5.799 habitantes y su área municipal es de 51 Kmts².

En el Laboratorio de Nutrición Animal de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, ubicada en la ciudad de Tunja. Se realizó la exposición de las garrapatas a los extractos mediante la técnica de inmersión de hembras repletas descrita por Drummond *et al.*, (1973).

6.2 UNIDAD EXPERIMENTAL

Se utilizaron garrapatas del género *R. (B) microplus* las cuales estaban completamente repletas de sangre (teleoginas); se colectaron manualmente hasta obtener una cantidad mínima de 180 especímenes y de acuerdo con sus características morfológicas se identificaron utilizando las claves taxonómicas recopiladas por Ruedisueli y Manship, (2006). Una vez identificadas, se lavaron con agua y se sumergieron durante un minuto en una solución de hipoclorito de sodio al 1% para desinfectarlas y evitar la contaminación bacteriana o por hongos. Después se secaron con papel absorbente y se pesaron individualmente para obtener el peso promedio por hembra (250 ± 20 mg peso optimo) y así conformar grupos homogéneos.

Durante toda la fase experimental se mantuvieron en una incubadora (Memmert) bajo condiciones controladas de temperatura (27°C) y 85% de humedad relativa, la humedad se controló con un termohigrometro digital el tiempo que duró el tratamiento. Diariamente se examinaron visualmente o con la ayuda de un estereoscopio para registrar la vitalidad de las garrapatas.

6.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

Las 180 garrapatas se dividieron al azar en 6 grupos, teniendo cuidado que cada grupo tuviera garrapatas de peso y tamaño equivalente. Todos los grupos de tratamiento se hicieron por triplicado.

- Grupo 1 (n=10) las garrapatas de este grupo se expusieron al extracto puro de *P. bogotensis*.
- Grupo 2 (n=10) las garrapatas de este grupo se expusieron al extracto puro de *A. alcuminata*
- Grupo 3 control positivo (n=10) las garrapatas de este grupo se expusieron a un ixodocida comercial a base de cipermetrina al 15%, preparado según las recomendaciones de la etiqueta (dilución 1:1.000 en agua).
- Grupo 4 control negativo (n=10) las garrapatas de este grupo se expusieron a agua solamente.
- Grupo 5 control negativo (n=10) las garrapatas de este grupo no se expusieron a ninguna sustancia.
- Grupo 6 control negativo (n=10) las garrapatas de este grupo se expusieron a etanol al 96 %.

6.4 PROCEDIMIENTOS

6.4.1 Recolección de Plantas y Elaboración de Extractos.

La recolección del material vegetal de *P. bogotensis* y *A. alcuminata* se realizó en la granja la María propiedad de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, donde se cortaron las hojas con tijeras, antes de la floración.

La obtención de los extractos de *P. bogotensis* y *A. alcuminata*, se logró a través del método de extracción en caliente (soxhlet), el cual consistió en:

El material vegetal (hojas) se fraccionó, para aumentar la superficie de contacto del solvente con el material a extraer para facilitar la mayor disolución de principios activos. Se colocó en la cámara de extracción del equipo Soxhlet (aproximadamente 200 gr).

Luego se calentó el etanol situado en el recipiente contenedor evitando que llegara a ebullición; el vapor del solvente ascendió hasta el condensador, lo cual permitió que el solvente se depositara gota a gota sobre la muestra, con ello se obtuvo el extracto vegetal. Cuando el nivel de solvente condensado en la cámara de extracción alcanzó la parte superior, éste rebozó y retornó junto con los compuestos al recipiente contenedor de solvente.

Este proceso se repitió múltiples veces hasta que se completó la extracción de los compuestos presentes en la planta y se concentró en el disolvente, lo cual constituyó el extracto final. Para dicha extracción se emplearon 150 mL de solvente (etanol al 96% de pureza), de los cuales se recuperó aproximadamente el 50% mediante concentración en el rota evaporador a una temperatura de 78°C y 60 rpm, el producto final fue de 20 ml de extracto puro.

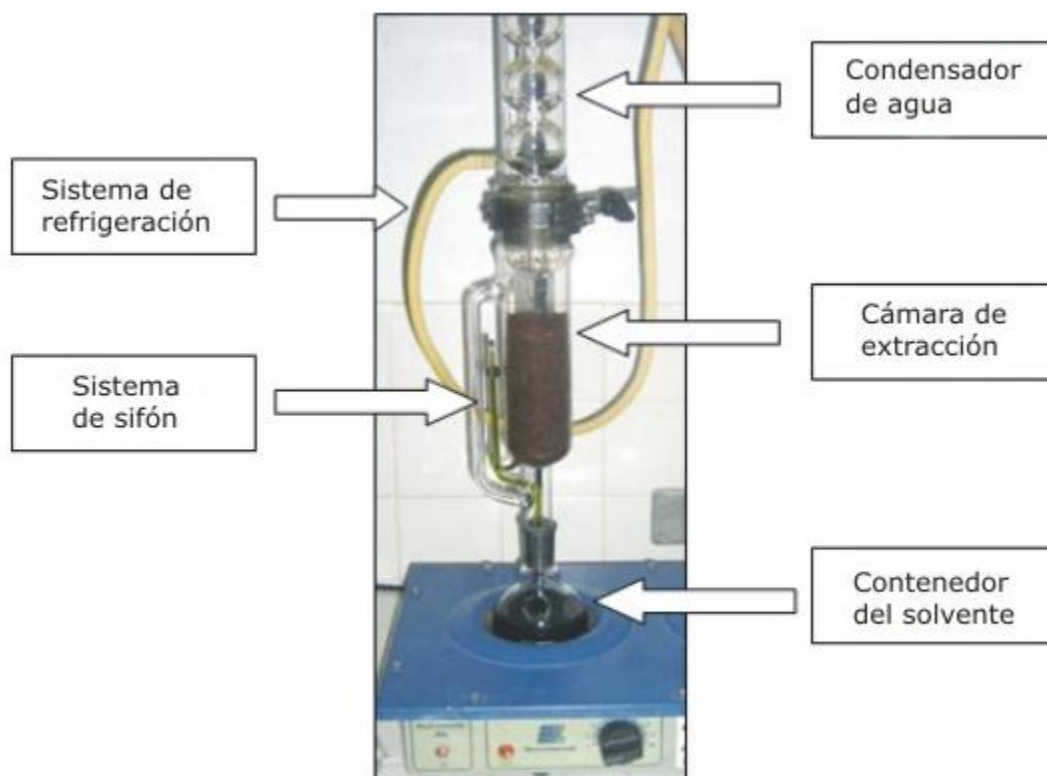


Figura 4. Elaboración de los extractos etanólicos

Fue así como se lograron los extractos puros a partir de los cuales se evaluó posteriormente la eficacia ixodocida de los mismos (Figura 4 y 5).



Figura 5. Extractos puros

6.4.2 Recolección de Garrapatas y Mantenimiento en Laboratorio.

En el municipio de Nuevo Colón, Boyacá se buscaron bovinos infestados con garrapatas completamente repletas de sangre (Teleoginas), la recolección se realizó de forma manual, una vez ubicada la garrapata, se tomó de la base y se haló de manera regular hasta desprender la garrapata (Figura 6).



Figura 6. Recolección de *R. B microplus*

Una vez desprendida se colocó la garrapata en un frasco de vidrio adecuado para su transporte.

En el laboratorio se revisaron una a una para desechar las muertas o mutiladas, como ya se mencionó; se lavaron y después se secaron con papel absorbente (Figura 7).



Figura 7. Exposición a los extractos

6.4.3 Identificación cualitativa de los metabolitos secundarios

Con el fin de corroborar la presencia de metabolitos secundarios, a cada uno de los extractos puros, se les realizó pruebas cualitativas así:

- Reacción de espuma (saponinas): la presencia de saponinas se determinó tomando 2 ml de cada extracto, se le añadió 10 ml de agua a cada uno, se agitó vigorosamente por 30 segundos y se dejó en reposo durante 15 minutos en la muestra (Rondina,1989). La proporción de saponinas se midió de acuerdo a la altura de la espuma sobrenadante así:
 - - Altura de menos de 5 mm = no se detectan saponinas
 - Altura de 5 – 9 mm = contenido bajo de saponinas
 - Altura de 10 – 14 mm = contenido moderado de saponinas
 - Altura mayor de 15 mm = contenido alto de saponinas
- Prueba de Wagner (alcaloides): para la prueba cualitativa de alcaloides se empleó el reactivo de Wagner (yodo y yoduro de potasio), se tomaron 2 ml de extracto y se le agregó 2 gotas de reactivo Wagner, se agitó con una varilla de vidrio y se esperó un precipitado de color marrón (Jurado, 2010).
- Reacción legal (cumarinas): La presencia de cumarinas se determinó fácilmente mediante la adición de 2 ml de solución de nitroprusiato de sodio al 0,5 % y 2 gotas de hidróxido de potasio, cuando presentó un color amarillo que desaparece al agitar el tubo de ensayo, la prueba es positiva (Maldoni, 1991).
- Prueba de Shinoda (flavonoides): La prueba cualitativa de los flavonoides se determinó tomando 2 ml de extracto y se le adicionó limaduras de magnesio seguido de ácido clorhídrico concentrado y se consideró positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo, intensos en

todos los casos. Aunque no se conoce el mecanismo de esta prueba, es muy utilizada para reconocer esta clase de compuestos (Jurado, 2010).

6.4.4 Elaboración de diluciones

Para probar los extractos se utilizó el modelo experimental de mínimas y máximas de efectividad biológica es decir la mínima concentración a la cual se consigue efectividad igualmente la máxima concentración a la cual se consigue su efecto (FAO, 1985).

Las diluciones se realizaron con agua destilada a partir del extracto puro de cada planta, se inició con una dilución 1:2 es decir 5 ml de extracto puro y 5 ml de agua destilada (solución) para completar los 10 ml de la dilución; si esta superaba una mortalidad del 60%, (tomada como mínimo eficaz) esta dilución se disminuyó a la mitad de la concentración, es decir, 2,5:10, así sucesivamente hasta que la dilución dejara de mostrar efectividad (Figura 8).



Figura 8. Preparación de diluciones

6.4.5 Prueba de eficacia en garrapatas adultas

La exposición de las garrapatas a los extractos, se hizo mediante, la prueba de inmersión de adultas (Drummond *et al.*, 1973. Para esto, en una caja de Petri se depositaron 5 ml del extracto a probar (puro o dilución), luego se colocaron allí las garrapatas (n=10), las cuales se sumergieron completamente con la ayuda de una

aguja punta roma, para evitar daño en la cutícula, permaneciendo sumergidas durante 15 min; completado este tiempo, se eliminó la totalidad del extracto, dejando así, las garrapatas en un medio seco. Posteriormente las cajas se taparon con un lienzo y se rotularon, indicando el nombre del extracto, la dilución y hora de exposición (Coronado y Enriquez, 2008).

Finalmente, la lectura de mortalidad se realizó a las 24-48-72 y 96 horas, se consideró como garrapatas muertas, aquellas que luego de una exposición a una fuente luminosa (lámpara halógena 6 V; 25 W) (Gallardo, 1999) por 10 minutos (Figura 9) mostró ausencia de movimientos en sus patas. Se tomó como valor mínimo de eficacia, una mortalidad del 60%, por lo cual valores inferiores fueron tomados como ineficacia. En el trabajo se tomó como valor aceptado una mortalidad no mayor al 10% en los grupos control de lo contrario se sospecharía de malos manejos del material biológico (FAO, 1993).



Figura 9.Lectura de mortalidad

El criterio de efectividad de las soluciones, fue tomado según la mortalidad encontrada 24, 48, 72 y 96 horas después de realizada la prueba de inmersión de adultas.

Se realizaron observaciones diariamente y se llevó un seguimiento de los datos; hasta el punto de poder calcular la eficacia de los extractos naturales en la supervivencia de las garrapatas, tanto de los grupos control como de los grupos experimentales, de la siguiente manera:

$$\text{Mortalidad} = \frac{\text{garrapatas muertas}}{\text{total de garrapatas}} \times 100$$

La eficacia de mortalidad en los diferentes extractos fue evaluada a través de la mortalidad de teleóginas *R. (B) microplus* del grupo control y de cada tratamiento con la siguiente formula (Álvarez *et al*, 2008).

$$\text{EM} = \frac{(\text{PORCENTAJE SUPERVIVENCIA gc} - \text{PORCENTAJE SUPERVIVENCIA gt})}{\text{PORCENTAJE SUPERVIVENCIA gc}} \times 100$$

gc = grupo control

gt= grupo tratado

6.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó la prueba de χ^2 con un nivel de confianza de 95 %, con el cual se determinó el porcentaje de mortalidad para determinar si hay alguna diferencia entre los siguientes variables:

- Porcentaje de mortalidad con *P. bogotensis* en el extracto puro y su dilución.
- Porcentaje de mortalidad con *A. acuminata*.
- Porcentaje de los grupos control.

7. RESULTADOS

7.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LOS EXTRACTOS

Una vez obtenidos los extractos puro de guaba y de aliso respectivamente. Mostraron características físicas propias (Tabla 1).

Tabla 1. Características Físicas

Planta	Color	Olor	Aspecto
<i>Phytolacca bogotensis</i> (Guaba)	Verde pasto	Característico	Líquido
<i>Alnus acuminata</i> (aliso)	Marrón oscuro	Melaza	Líquido

7.2 Pruebas cualitativas de los metabolitos secundarios

En lo que respecta al análisis cualitativo de metabolitos secundarios y teniendo en cuenta el orden secuencial para el análisis colorimétrico para la identificación de saponinas, flavonoides, alcaloides y cumarinas, se encontró que ambas plantas contienen cumarinas y que la presencia de los demás metabolitos cambio entre una y otra (Tabla 2).

Tabla 2. Presencia de metabolitos secundarios

	Saponinas	Alcaloides	Cumarinas	Flavonoides
<i>A. acuminata</i>	-	+	+	-
<i>P. bogotensis</i>	+	-	+	+

(+)=positivo, (-)=negativo

7.2.1 Prueba de saponinas

El único extracto que dio positivo a saponinas fue el extracto de *P. bogotensis*, el cual presentó un sobrenadante de espuma con una altura de 20 mm, con una persistencia por más de 2 minutos (Figura 10).



Figura 10. Análisis cualitativo de saponinas

7.2.2 Prueba de Wagner

El resultado de la evaluación colorimétrica para la identificación de alcaloides solo fue positivo en el extracto de *A. acuminata*, donde se evidenció coloración marrón a roja al agregar el reactivo de Wagner lo que indicó presencia de alcaloides (Figura 11).



Figura 11. Análisis cualitativo de alcaloides

7.2.3 Reacción para cumarinas

En cuanto al análisis preliminar de cumarinas los dos extractos dieron positivo observándose una coloración amarilla al agitar el tubo de ensayo (Figura 12).

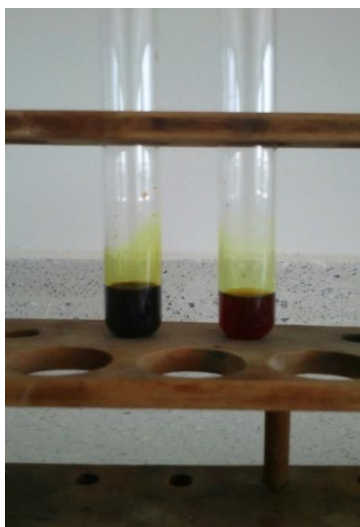


Figura 12. Análisis cualitativo de cumarinas

7.2.4 Prueba de Shinoda

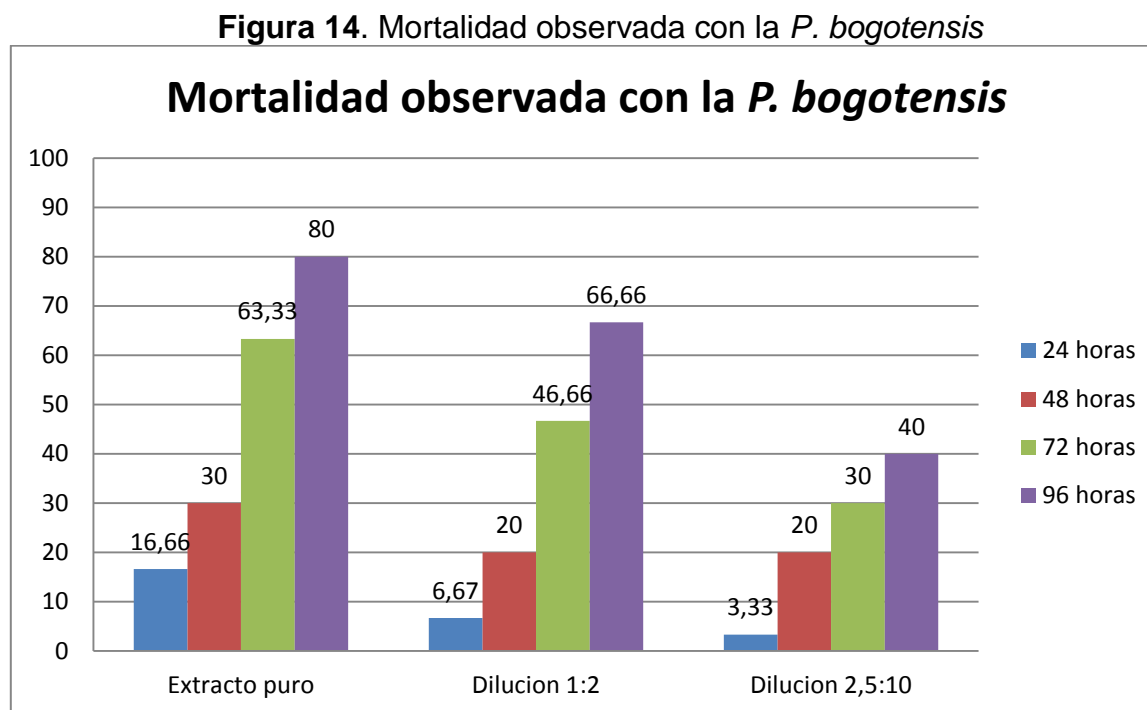
El único extracto que presentó un cambio de coloración verde violeta positivo evidente para flavonoides después de dos minutos de realizada la prueba, fue el extracto de *P. bogotensis* (Figura 13).



Figura 13. Análisis cualitativo de flavonoides

7.3 Eficacia ixodocida de la *Phytolacca bogotensis* (guaba)

Según lo planteado en este estudio el extracto de *P. bogotensis* (guaba), mostró la mayor eficacia sobre garrapatas hasta la dilución 1:2, observándose diferencias estadísticamente significativas con las pruebas con extracto puro (Ext. Puro), la dilución 1:2 y 2,5:10 (Figura 14).



Se observa una mortalidad acumulada en aumento con el tratamiento con *P. bogotensis* desde las 48 hasta las 96 horas post- aplicación, en el extracto puro y sus diluciones.

Se realizó la prueba χ^2 para determinar si hay alguna diferencia entre los valores de porcentaje de mortalidad con *P. bogotensis* en el extracto puro y su dilución 1:2, se formulan las siguientes hipótesis (Tabla 3):

Hipótesis nula: (H_0): los porcentajes de mortalidad con *P. bogotensis* no presentan diferencias significativas ($p \geq 0.05$)

Hipótesis alterna: (H_a): Ha: los porcentajes de mortalidad con *P. bogotensis* presentan diferencias significativas ($p < 0.05$)

Tabla 3. Análisis estadístico mortalidad con *P. bogotensis* y la dilución 1:2

	24h			48h			72h			96h	
Puro	16,66	11,665	Puro	30	25	Puro	63,33	54,995	Puro	80	73,33
Dilución 1: 2	6,67	11,665	Dilución 1: 2	20	25	Dilución 1: 2	46,66	54,995	Dilución 1: 2	66,66	73,33
	23,33			50			109,99			146,66	
Valor p	0,0386142		Valor p	0,1572992		Valor p	1,12E-01		Valor p	0,270662	
Chi2	4,2777583		Chi2	2,0000000		Chi2	2,5264924		Chi2	1,2133888	

Se realizó la prueba χ^2 para determinar si hay alguna diferencia entre los valores de porcentaje de mortalidad con *P. bogotensis* en el extracto puro y su dilución 2,5:10, se formulan las siguientes hipótesis (Tabla 4):

Hipótesis nula: (H_0): los porcentajes de mortalidad con *P. bogotensis* no presentan diferencias significativas ($p \geq 0.05$)

Hipótesis alterna: (H_a): Ha: los porcentajes de mortalidad con *P. bogotensis* presentan diferencias significativas ($p < 0.05$)

Tabla 4. Análisis estadístico mortalidad con *P. bogotensis* y la dilución 2,5:10

	24h			48h			72h			96h	
Puro	16,66	9,995	Puro	30	25	Puro	63,33	46,665	Puro	80	60
Dilución 2,5:10	3,33	9,995	Dilución 2,5:10	20	25	Dilución 2,5:10	30	46,665	Dilución 2,5:10	40	60
	19,99			50			93,33			120	
Valor p	0,00286911		Valor p	0,15729921		Valor p	0,00056049		Valor p	0,00026073	
Chi2	8,88888944		Chi2	2		Chi2	11,9028062		Chi2	13,33333333	

En cuanto al porcentaje y eficacia de mortalidad sobre el tratamiento con *P. bogotensis* no hubo diferencias estadísticamente significativas cuando se analizaron los tratamientos con su respectivo grupo control (etanol y agua) (Tabla 4 y 5).

Tabla 5. Porcentaje y eficacia de mortalidad de la *P. bogotensis* con relación al grupo control (etanol)

	Porcentaje de mortalidad (%) a las 96 h	Eficacia de mortalidad (%) a las 96 h
Etanol 96 % (gc)	10	*
Ext. Puro (gt)	80	62,95
Dilución 1:2 (gt)	40	33,33

gc=grupo control, gt=grupo tratado

*No se calcula

**Eficacia mortalidad (EM)=% supervivencia gc- % supervivencia gt / %supervivencia gc x100

Tabla 6. Porcentaje y eficacia de mortalidad de la *P. bogotensis* con relación al grupo control (agua)

	Porcentaje de mortalidad (%) a las 96 h	Eficacia de mortalidad (%) a las 96 h
Agua (gc)	0	*
Ext. Puro (gt)	80	80
Dilución 1:2 (gt)	40	40

gc=grupo control, gt=grupo tratado

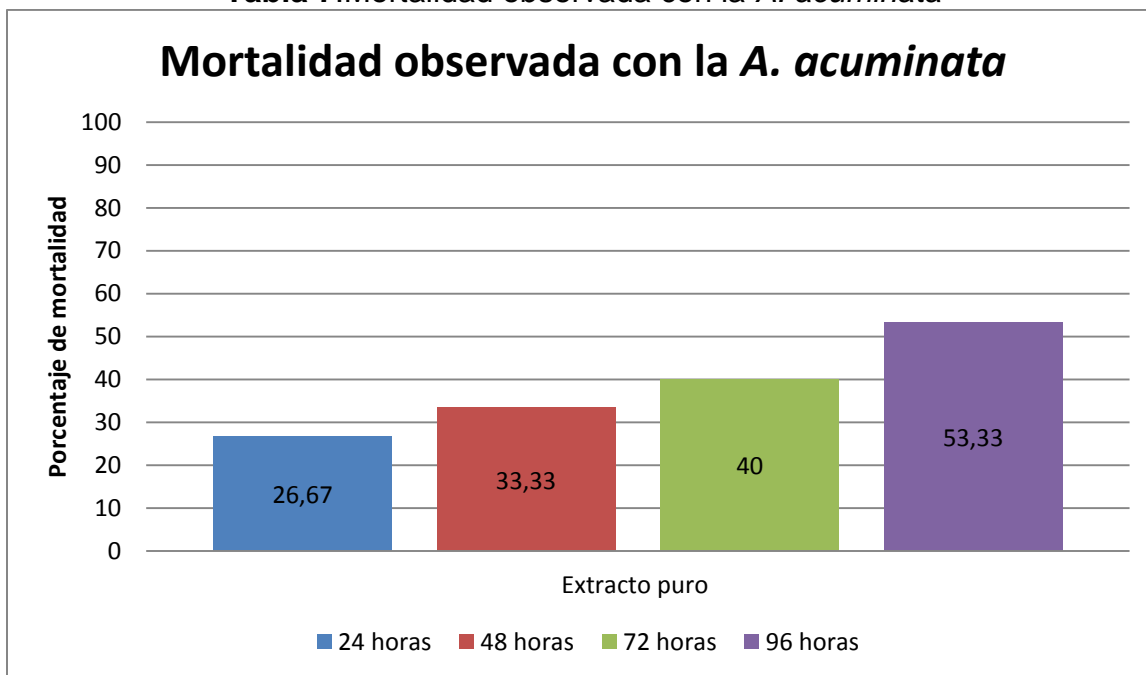
*No se calcula

**Eficacia mortalidad (EM)=% supervivencia gc - % supervivencia gt / %supervivencia gc x100

7.4 Eficacia ixodida de la *Alnus acuminata* (Aliso)

Analizando el extracto de *A. acuminata* (aliso), se observó un mínimo de eficacia de mortalidad con el extracto puro (Tabla 7).

Tabla 7. Mortalidad observada con la *A. acuminata*



Se observa una mortalidad acumulada con el tratamiento con *A. acuminata* con un aumento significativo en el extracto puro desde las 48 horas post – aplicación.

Se realizó la prueba χ^2 para determinar si hay alguna diferencia entre los valores de porcentaje de mortalidad con *G. sepium*, se formulan las siguientes hipótesis (Tabla 8):

Hipótesis nula: (H_0): los porcentajes de mortalidad de *A. acuminata* y control no presentan diferencias significativas ($p \geq 0.05$)

Hipótesis alterna: (H_a): los porcentajes de mortalidad de *A. acuminata* y control presentan diferencias significativas ($p < 0.05$)

Tabla 8. Análisis estadístico mortalidad con *A. acuminata*

TIEMPO	24h	48h	72h	96h	
Puro	26.67	33.33	40	53.33	153.33
Esperado	38.3325	38.3325	38.3325	38.3325	
Valor p	0.0174018				
Chi2	10.1413807				

Hipótesis nula: (H_0): los porcentajes mortalidad practico y teórico no presentan diferencias significativas ($p \geq 0.05$)

Hipótesis alterna: (H_a): los porcentajes practico y teórico de mortalidad son diferentes ($p < 0.05$)

96h	53.33	56.665
Teórico	**60	56.665
	113.33	
Valor p	0.53095647	
Chi2	0.39256066	

**El mínimo eficaz de mortalidad es de 60%

En el porcentaje y eficacia de mortalidad sobre el tratamiento con *A. acuminata* no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 7,8 y 9).

Tabla 9. Porcentaje y eficacia de mortalidad de la *A. acuminata* con relación al grupo control (etanol)

	Porcentaje de mortalidad (%) a las 96 h	Eficacia de mortalidad (%) a las 96 h
Etanol 96 % (gc)	10	*
Ext. Puro (gt)	53,3	40,74

gc=grupo control, gt=grupo tratado

*No se calcula

**Eficacia mortalidad (EM)=% supervivencia gc - % supervivencia gt / %supervivencia gc x100

7.5 Resultados de los grupos control

Durante el desarrollo de la investigación se realizó una prueba testigo con un control positivo cipermetrina (diluciones según etiqueta), un control negativo con agua destilada, uno con etanol al 96% y uno sin ninguna sustancia. Para el caso

de la cipermetrina se observó una mortalidad del 70% y para los grupos control negativo se observó una mortalidad no mayor al 10%, esto indica que no intervinieron factores ambientales en la mortalidad de las garrapatas de los grupos tratados (Tabla 10).

Tabla 10. Mortalidad de los grupos control

Grupo	Porcentaje de mortalidad (%)			
	24h	48h	72h	96h
Grupo (+)	30	40	50	70
Grupo (etanol 96%)	0	0	10	10
Grupo (ninguna sustancia)	10	10	10	10
Total	40	50	70	90

Se realizó la prueba χ^2 para determinar si hay alguna diferencia entre los valores de porcentaje de los grupos control, se formulan las siguientes hipótesis (Tabla 11):

Hipótesis nula: (H_0): los promedios de porcentaje de mortalidad de grupos control no presentan diferencias significativas ($p \geq 0.05$)

Hipótesis alterna: (H_a): por lo menos un grupo control presenta un porcentaje de mortalidad diferente ($p < 0.05$)

Tabla 11. Análisis estadístico de los grupos control

	Esperado	Esperado	Esperado	Esperado
Grupo (+)	13,33	16,67	23,33	30,00
Grupo (etanol 96%)	13,33	16,67	23,33	30,00
Grupo (ninguna sustancia)	13,33	16,67	23,33	30,00
valor p	2,511E-08	5,1091E-12	1,1838E-10	4,2484E-18
valor chi	41,1427337	58,8298675	45,7142857	80

8. DISCUSIÓN

Como se dijo anteriormente, en el extracto de *P. bogotensis*, en este estudio se encontró la presencia de saponinas, cumarinas y flavonoides, mostrando resultado negativo para alcaloides (Tabla 2). Según la literatura la guaba contiene dos triterpenos pentacíclicos y cinco saponinas triterpénicas (Salama *et al.*, 1996); La presencia de saponinas triterpénicas en la *Phytolacca* puede explicar su utilidad en el control de las garrapatas, que parasitan el ganado bovino. La actividad acaricida y larvicida de plantas y extractos que contienen saponinas se encuentra bien documentada en la literatura (Fernandez *et al.*, 2007) (Habeeb, 2010). En el presente estudio no se identificaron alcaloides lo cual difiere con estudios cromatográficos realizados con esta planta (Gutiérrez *et al.*, 2008)

A pesar de que se esperaba la presencia de alcaloides estos resultados pueden justificarse por varios factores dentro de los que se destaca el método de extracción utilizado, las características climáticas y del suelo de donde provengan las plantas, así como la etapa del ciclo biológico de cada planta en la cual se tomó la muestra. Lo anterior también explica, cómo las plantas pierden la eficacia medicinal cuando se cambian las condiciones edafoclimáticas, lo cual es necesario tenerlo en cuenta en la práctica de la fitoterapia, haciendo necesario la realización de estudios de fitoquímica que garanticen la presencia de los metabolitos secundarios de interés (Almeida *et al.*, 2010).

Por otra parte, en este estudio para el aliso se encontraron alcaloides y cumarinas, lo cual difiere con otros estudios fitoquímicos, en donde mostró la presencia de esteroides, triterpenos, flavonoides, taninos y compuestos fenólicos.

En el estudio de Galvis y León (1989), no se encontraron alcaloides y cumarinas, pero si fueron aislados diferentes compuestos terpenicos. Así mismo fueron detectados y aislados varios flavonoides (Finnegan, 1972), taninos y compuestos fenólicos (Karchesy, 2007) de varias especies del género *Alnus*, lo cual se puede

explicar por los factores agroclimáticos ya mencionados, así como por la variedad de la planta y el tipo de material vegetal utilizado (hojas, tallos, flores, frutos y raíces) (Ferreira *et al*, 2010; Clement, 1994).

Con relación al efecto ixodocida de la *P. bogotensis* en este trabajo se alcanzó una mortalidad alta para el extracto puro su dilución 1:5 y 2.5:10 con 80%, 66,66% y 40% respectivamente. Teniendo en cuenta que la eficacia de mortalidad mínima para este estudio fue de 60%, se observa que los resultados fueron los esperados por la presencia de flavonoides y saponinas, los cuales son sustancias que evitan o interrumpen el proceso de alimentación de la garrapata tras un consumo inicial del extracto y conducen de esta manera a su muerte por inanición o intoxicación (Wu, 2004).

Como ya se mencionó se identificaron cumarinas en las muestras evaluadas de *P. bogotensis* aunque algunos autores indican ausencia de este metabolito (Galvis y león,1989). Es así como se ha demostrado el efecto antiparasitario de las cumarinas extraídas de diferentes plantas, sobre *Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa zea* (Dowd *et al.*, 2011), lo que podría explicar la acción ixodocida de la *P. bogotensis* en este estudio.

En este estudio, a las 24, 48, 72 y 96 horas después de la aplicación de los tratamientos con los extractos puros y sus diluciones, se observó la eficacia con base al porcentaje de mortalidad; sin embargo, se observó que el extracto de *A. acuminata* mostro eficacia mínima con el extracto puro.

Con respecto a que *A. acuminata* en este trabajo no fue eficaz, con lo que se puede pensar, que la planta no tiene capacidad ixodocida, o bien el extracto no logró superar la cutícula de la garrapata o la concentración mínima tóxica no fue alcanzada. Sin embargo, en otros casos las plantas que contienen (alcaloides y cumarinas) tienen acción ixodocida (Gutiérrez *et al.*, 2008).

El *A. acuminata* a pesar de la poca eficacia que mostró en este estudio, en la tradición popular las hojas son usadas en el control de ectoparasitos (Bernal y Correa, 1989).

De forma similar a lo encontrado con el *Alnus acuminata*, en este estudio se encontró un efecto ixodicida acumulativo expresado en una mayor mortalidad a medida que aumentaba el tiempo después de la exposición inicial. Este comportamiento se ha observado en otros estudios realizados con los aceites de limoncillo por Heimerdinger *et al.*, (2006), al evaluar los extractos etanólicos de esta planta (*Cymbopogon citratus*) sobre la garrapata *R. (B) microplus*, encontrando una mortalidad de 40,3%, 41,5% y 46,6% post tratamiento respectivamente.

Al hacer una comparación de los resultados obtenidos, con lo reportado por Alvarenga y Maria (2011), quienes mencionan que los extractos obtenidos de jaboncillo (*Phytolacca icosandra*) con una concentración 1:5, 1:10 y una concentración de 1:15. Se obtuvo efecto acaricida contra *demodex canis* in vitro en las tres concentraciones.

A pesar que no se encuentran otros estudios sobre esta planta para el control de garrapatas, otras plantas medicinales de frecuente hallazgo en el departamento de Boyacá han demostrado efecto ixodicida, como extracto puro y en diluciones similares a las utilizadas en este estudio. Dentro de dichas plantas se destaca *Nicotiana tabacum*, *Brugmasia arbórea*, con mayor eficacia, seguidas por *Sambucus nigra* y *Bidens pilosa* (Rodríguez *et al*, 2010). Igualmente estudios realizados con las mismas plantas, para evaluar el efecto insecticida sobre la mosca *Haematobian irritans* indican mayor eficacia para el tabaco seguida por *Brugmasia arbórea* y *Sambucus nigran* con menor eficacia, para *Bidens pilosa* y la *Ambrosia cumarensis*, cuando el extracto se obtuvo por el método de Soxhlet que cuando este se hace por extracción etanólica en frío (Ortíz *et al.*, 2009)

Es así como, comparando los resultados obtenidos con las dos plantas evaluadas, se puede afirmar que, en este estudio, la *P. bogotensis* presentó mayor eficacia contra las garrapatas (Tabla 3), superando al tratamiento con *Alnus acuminata* por cerca de un 30 % en la mortalidad.

Tal como se indicó en los resultados, los porcentajes de mortalidad observados en los grupos control, determinan que el grupo positivo, en el cual el tratamiento se realizó con un ixodicida comercial a base de cipermetrina al 15%, mostró una eficacia del 70%, ratificando el poder ixodicida de dicho compuesto; los demás grupos control, en este estudio mostraron un porcentaje de mortalidad no superior al 10%, la cual es aceptable y se justifica por la variación en las condiciones ambientales; igualmente se considera que el solvente etanol al 96 %, no causaron la mortalidad observada y que esta se debió al efecto de los metabolitos de las plantas evaluadas.

Mientras que el tratamiento control tuvo un porcentaje de inhibición del 0%, lo que indica que estos artrópodos tienen una alta resistencia y adaptación al medio ambiente, en condiciones de latencia. Según Rodríguez (2009), pueden llegar a pasar varios meses sin alimentarse, gracias a que poseen un exoesqueleto duro que recubre su cuerpo segmentado, protegiéndolas de las condiciones adversas.

Es de anotar que en experimentos realizados para evaluar el efecto ixodicida *in vivo* de los extractos vegetales, no siempre se presentan resultados con relaciones lineales ya que su mecanismo de respuesta depende de la densidad de población del parásito, de la capacidad de resistencia de los mismos y así como de los factores climáticos (Rodríguez *et al.*, 2006; Tho, 2003). Es así como, al evaluar *in vivo* los extractos vegetales ya probados en ensayos *in vitro*, se puede encontrar equivalencia en las eficacias o disminución de la misma, cuando se usan en campo, no solo por los factores antes mencionados, sino también por el método de extracción utilizado (Alfonso, 2009). Es por lo anterior, que siempre que se

determina eficacia ixodocida in vitro es necesario evaluar esta misma in vivo utilizando animales naturalmente parasitados.

9. CONCLUSIONES

Con la caracterización fitoquímica de la *A. acuminata* recolectada se encontró que los principales metabolitos secundarios de la planta son: alcaloides y cumarinas.

Los metabolitos secundarios presentes en la *P. bogotensis* colectada son: saponinas, cumarinas y flavonoides.

El extracto obtenido de *P. bogotensis* puede constituirse en una fuente de principios activos que contribuyan al descubrimiento de ixodicidas de origen natural los cuales pueden ser utilizados como línea base para la síntesis de moléculas útiles a nivel farmacéutico.

La influencia del tiempo de extracción y tipo de solvente no es significativa en el proceso y no tiene un efecto apreciable en el rendimiento.

Se puede concluir que el extracto que presento el mejor índice de mortalidad sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* fue el obtenido con la planta *Phytolacca bogotensis*

10.RECOMENDACIONES

Es necesario realizar estudios con garrapatas mantenidas en laboratorio durante todo su ciclo biológico.

Es necesario investigar diversos tipos de solventes con el fin de lograr una penetración eficaz de los compuestos activos en la cutícula del parásito y con ello facilitar la acción de éstos.

Realizar pruebas, evaluando efectos repelentes, inhibidores de queratina y supresores de la ovulación

Realizar pruebas *in vivo* y estudios de toxicidad, que permitan conocer el riesgo potencial de estas plantas promisorias en las especies animales de interés.

Realizar la elaboración de extractos con exposición a altas temperaturas para obtener concentraciones de metabolitos más altas y eficaces.

Evaluar el efecto de la *P. bogotensis* (Guaba) como ixodicida en otras especies de garrapatas.

Continuar con estudios *in vitro* para identificar otras plantas y diferentes estructuras, para ser evaluadas como ixodicidas en condiciones *in vitro*.

11.BIBLIOGRAFÍA

ADAMS R, 2003. Farmacología Y Terapéutica Veterinaria. 2da Edición, México. Ed. ACRIBIA S.A. (10): 110

ALFONSO T y RODRIGO J ,2009. Evaluación in vivo del efecto ixodicida del extracto de tabaco (*nicotiana tabacum*) con tres metodos de extracción, infusión, decocción y licuado sobre garrapatas en mani casanare Universidad pedagógica y tecnológica de colombia - uptc – tunja

ALI N, SHAH SW, SHAH I, AHMED G, GHAS M, KHAN I, 2011. Cytotoxic and anthelmintic potential of crude saponins isolated from *Achillea Wilhelmsii* C. Koch and *Teucrium Stocksianum* boiss. [BMC Complement Altern Med.](#) Peshawar, KPK, Pakistan. 11: 106.

ALMEIDA LF, FREI F, [MANCINI E](#), [DE MARTINO L](#), [DE FEO V](#), 2011. Phytotoxic activities of Mediterranean essential oils. [Molecules](#). Botucatu-SP, Brazil. 15(6):4309-4323.

ALVARENGA, G., & MARÍA, G. 2011. *Comparación de tres concentraciones de las plantas medicinales: Ixmaxim (Mychrossechium helleri) y jaboncillo (Phytolacca icosandra) como efecto acaricida contra Demodex canis in vitro* (Doctoral dissertation, Universidad de San Carlos de Guatemala).

ÁLVAREZ V, LOAIZA J, BONILLA R Y BARRIOS M, 2008. Control *in vitro* de garrapatas (*Boophilus microplus*; Acari: Ixodidae) mediante extractos vegetales. Revista de Biología Tropical .San José, Costa rica. 56 (1): 291-302

ANGEL-SAHAGÚN, C. A.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; MOLINA-OCHOA, J.; GALINDO-VELASCO, E.; LÓPEZ-EDWARDS, M.; REBOLLEDO-DOMÍNGUEZ, O.

et al. 2005. Susceptibility of biological stages of the horn fly, *Haematobia irritans*, to entomopathogenic fungi (Hyphomycetes). *Journal of Insect Science*, v. 5, n. 50, 8p. Disponible en: . Acceso: junio 2016.

ARAQUE, A., UJUETA, S., BONILLA, R., GÓMEZ, D., & Rivera, J. 2014. Resistencia a acaricidas en *Rhipicephalus (boophilus) microplus* de algunas explotaciones ganaderas de Colombia. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 17(1): 161-170.

BETANCOURT A, PATIÑO F, TORRES O y EUGENIO B. 2005. Prueba de establo para evaluar efectividad de la vacuna Tick-Vac Mk® contra la garrapata *Boophilus Microplus*. *Revista ACOVEZ*, 34 (3): 18-25.

BURNS, R.C.; HARDY, R.W. 1975. Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. SpringerVerlag. Berlin, 189 p.

CACERES, H.: OYOLA, G. 1981. Estudio preliminar sobre la obtención de pulpa al sulfato a partir del aliso (*Alnus jorullensis*). Universidad Industrial de Santander. Centro de Investigaciones en celulosa y papel. Bucaramanga. 90 p

CARDOZO N. 2013. Detección In Vitro de Resistencia de Garrapatas *Boophilus microplus* a Deltametrina 12.5%, Amitraz 5% y Coumaphos 50% en tres Provincias de Perú. (Internet) (30 mayo 2013) Disponible en: <http://www.perulactea.com/2013/05/30/deteccion-invitro-de-resistencia-de-garrapatas-boophilus-microplus-a-deltametrina-12-5-amitraz-5-ycoumaphos-50-en-tres-provincias-de-peru/>

CLEMENT J, 1994. Chemical review and evolutionary significance of the betalains. *Caryophyllales*. Berlin: Springer. 30: 247- 261.

COELLO IZQUIERDO, M. A. 2015. Caracterización e identificación de garrapatas en bovinos de 3 islas en la provincia de Galápagos.

CORDERO Del campillo; M y colaboradores, 2000. Parasitología Veterinaria.

CORONADO A, HENRÍQUEZ H, 2008. Eficacia *in vitro* del amitraz sobre poblaciones de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* provenientes de explotaciones lecheras del estado Lara, Venezuela. *Zootecnia Trop*; 26(1):35-40.

DOMÍNGUEZ, D., AGATÓN, F. T., & CRUZ, R. R. 2016. Evaluación económica del control de garrapatas *Rhipicephalus microplus* en México. *Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias: CIBA*, 5(9): 43-52.

DOMÍNGUEZ, M.C, 2008. Fitoterapia, medicina natural Disponible en [<http://personal.redestb.es/martin/PFITO.HTM>] [consultado el 18 de mayo de 2016]

DOWD PF, BERHOW MA, JOHNSON ET, 2011. Differential activity of multiple saponins against omnivorous insects with varying feeding preferences. [J Chem Ecol](#). 37 (5): 443-9.

DRUMMOND R, ERNST S, TREVINO J, GLADNEY W, GRAHAM O. 1973. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: Laboratory test of insecticides. *J Econ Entomol* 66: 130-133.

DUARTE E.R. 2014. Extrato alcohólico de Capim-cidreira (*Cymbopogon citratus*) no controle do *Boophilus microplus* em bovinos. *Rev Bras Parasitol Vet*, 15:37–39.

ERRECALDE, C., PRIETO, G., LÜDERS, C., & GARCÍA, H. 2009. Naturaleza y control de la quimiorresistencia en ectoparásitos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias (Colombian journal of animal science and veterinary medicine)*, 16(3), 257-267.

FAO ANIMAL PRODUCTION AND HEALTH PAPER 36. Ticks and tick-borne diseases. Selected articles from the WORLD ANIMAL REVIEW.

FAO, 1985. Código Internacional de Conducta para la distribución y utilización de Plaguicidas. Roma. Disponible en [\[http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Code/spanish.pdf\]](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Code/spanish.pdf) [consultado el 1 de marzo de 2016]

FAO, 1993. Norma Mexicana N 006 – Zoo, requisitos de efectividad biológica para los ixodídeos de uso en bovinos y método de prueba. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, México. Disponible en [\[http://www.rr-americas.oie.int/in/proyectos/Camevet/Normas_paises/Normativas%20Paises/Mexico/Nom-006.htm\]](http://www.rr-americas.oie.int/in/proyectos/Camevet/Normas_paises/Normativas%20Paises/Mexico/Nom-006.htm) [consultado el 4 febrero de 2016]

FERNANDES F. F., LELES R.N., SILVA I.G., FREITAS E.P.S. 2007. *Arq Bras Med Vet Zootec* 59 (1): 145-149.

FERREIRA L, DIAS L, BARBOSA C, 2010. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Revista Brasileira. Parasitologia. Veterinaria. Jaboticabal*. 20 (2): 89-96

FINNEGAN, R. A., BACHMAN, P. L., & KNUTSON, D. (1972). occurrence of 5-hydroxy-4, 6, 7-trimethoxyflavone (psathyrocin= salvigenin) in *Psathrotes annua*. *Lloydia*.

GALLARDO JS, MORALES J. 1999. *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae): Preoviposición, ovoposición, incubación de los huevos y geotropismo. *Bioagro*.; 11(3):77-87.

GARCÍA, P.J.L. 2011. Evaluación de las propiedades acaricidas de *Piper crassinervium* Kunth. *Piper aequale* Vahl. (PIPERACEAE) sobre larvas de

Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Canestrini, 1887) (ACARI: IXODIDAE). Trabajo De Grado Para Optar El Título De Magister En Ciencias Agrarias Área Producción Animal Tropical. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias Agropecuarias Coordinación General de Postgrados Palmira.

GRISI, L., C.L.MASSARD, MOYA BORJA, G.E. et al.2002. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. A Hora Vet., 21(125): 8-10

GUTIÉRREZ A, VÁSQUEZ G, VILLEGAS C, 2008. Efecto tóxico de *Verbena officinalis* (familia verbenaceae) en *Sitophilus granarius* (coleoptera: curculionidae) Revista Lasallista de Investigación. Corporación Universitaria. 5 (2): 74-82.

HABEEB S. M. 2010. *World Appl Sci J* 11 (9):1047- 1054.

HEIMERDINGER A, OLIVO C, MOLENTO M, AGNOLIN C, ZIECH M, SCARAVELLI L, SKONIESKI F, OTH J, CHARAPAO P, 2006. Alcoholic extract of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) on the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in cattle. Revista Brasileira Parasitologia. Veterinaria. (15): 37-39.

J.J. KARCHESY, P.M. LOVELAND, M.L. LAVER, D.F. BAROFSKY, E. BAROFSKY.1976. Phytochemistry 15(12).

JUAREZ, F. C., & NOVARA, L. 1993. Phytolaccaceae. *Aportes Botanicos de Salta-Serie Flora*, 2(4):1-11.

JUNQUERA, P. 2007. Garrapatas *Boophilus* en el ganado bovino: biología, prevención y control. Disponible en [http://parasitosdelganado.net/index.php?option=com_content&view=article&id=26&Itemid=471] [consultado el 25 de abril de 2016]

JUNQUERA, P. Garrapatas *Boophilus* en el ganado bovino: biología, prevención y control. *Parásitos del ganado* [en línea] 2011 [citada 05 abr 2011]; 1-11.

JURADO B. 2010. Preparación de extractos y estudio fitoquímico de plantas biocidas. 1era edición .Universidad del Perú .Lima, Perú. P. 1-26.

KUNZ, S.E; KEMP, D.H. 1994. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impacts. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 13:1249–1286.

LÓPEZ, R. R. 2016. Contribución al conocimiento etnofarmacobiológico de plantas medicinales de la región Cañada, Oaxaca. *Revista Iberoamericana de Producción Académica y Gestión Educativa*.

LORENZO, P.; MORENO. A.; LEZA, J.C., LIZASOAIN, I., MORO, M.A. VELAZQUEZ, 2004. *Farmacología Básica y Clínica*. 17º Ed. Editorial. Médica Panamericana. P.1250

M. G. GALVIS, H. LEÓN. 1989. Determinación del efecto abortivo y antiinfertilidad de las diferentes fracciones del extracto etanólico de las hojas de *A. acuminata*, H.B.K, Trabajo de grado Químico Farmacéutico, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

MALDONI, B.1991. “Alkaloids: Isolation and Purification” *Journal of Chemical Education*, 68:700-703.

MAMALLACTA, L., & AZUCENA, L. 2013. Estudio Farmacognóstico y Actividad Cacatrizante del Jatun Quilun Quilun..

MARMANILLO LEIVA, A. M. 2015. Evaluación de la ivermectina al 1.8% adicionada con vitaminas a, dye en el control de garrapatas en bovinos de leche.

MARTINS, R.M. & GONZÁLEZ, F.H.D. 2007. Uso del aceite de citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) (Panicoidideae) como acaricida frente a la garrapata *Boophilus microplus* Canestrini (Acari: Ixodidae). *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*.9, (4):1-8.

MCGINLEY-Smith DE, Tsao SS. 2003. Dermatoses from ticks. *J Am AcadDermatol*. 49(3):363-92; quiz 393-6.

MEDELLIN, J. 2002. Anaplasmosis y Babesiosis en Tamaulipas. Clínica de Grandes Especies – Laboratorio de Diagnóstico – Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UAT. Tamaulipas – México. (www.fmvz.vet.edu.mx/investigaciones/12htm).

NAVARRETE S., M.G. 1990. Impacto en la Producción y en la Economía de las Enfermedades Hemoparasitarias. Experiencias de Monitoreo en Colombia. En: "Memorias Seminario Internacional sobre Diagnóstico, Epidemiología y Control de Enfermedades Hemoparasitarias" (Lobo, C.A. & González, C.A., eds.). Palmira, Colombia. P.80-95.

NORMAND, P.; LALONDE, M. 1982. Evaluation of Frankla strains Iso late from provenances of to *Alnus* species. *Canadlan Journal of Microbiology*. 28: 1133-1142.

OJEDA-CHI, M. M.; Rodriguez - vivas, R.I.; Galindo-Velasco, E.; R. Lezama - Gutiérrez. 2010. Laboratory and field evaluation of *Metarhiziumanisopliae*(Deuteromycotina: Hyphomycetes) for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari:Ixodidae) in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*.170: 348-354.

ORTIZ C, CARRILLO A, RODRIGUEZ C, ORTIZ C, RAMIREZ M, 2009. Evaluación in vitro del efecto insecticida de los extractos etanólicos de *Nicotiana*

tabacum, *Ambrosia cumanenses*, *Sambucus nigra*, *Bidens pilosa* y *Brugmasia arbórea* sobre la mosca *Harmatobia irritans*, utilizando dos métodos de extracción. Colombia. Revista Colombiana De Ciencias Pecuarias 22 (3):436 – 436.

PÉREZ L, PALMA C, VILLEGAS R, VEGA M, PÉREZR, .2006. Metodología analítica y detección de residuos de Ivermectina en muestras de leche de rebaños de la provincia de Ñuble, Chile. Archivos de Medicina Veterinaria. 38 (2): 143-150.

POAQUIZA, A., & ÁNGEL, L. 2012. Guía práctica para la elaboración de insecticidas orgánicos con plantas nativas de la zona, para prevenir plagas y enfermedades de las hortalizas: Aplicada al área de ciencias naturales con los niños/as de 6to año de educación general básica, en el cecib “provincia de Galápagos” de la comunidad Talahua, parroquia Simiatug, Cantón Guaranda, provincia de Bolívar.

POLANCO-ECHEVERRY, D. N., & RÍOS-OSORIO, L. A. 2016. Biological and ecological aspects of hard ticks. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 17(1): 81-95.

POMBO, M., BORREGO, P., BARAJAS, L., FORERO, A., MEJÍA, A., BUITRAGO, J., ... & CASTRILLÓN, W. 2014. Actividad antimicrobiana de *Phytolacca bogotensis* (guaba) sobre cepas patógenas prevalentes en Colombia. in *xii congreso colombiano de fitoquímica*.

POSADA, J. B.; LECUONA, R. E. 2009. Selection of native isolates of *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) for the microbial control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 46(2): 284-291.

PUCHETA-DÍAZ M, FLORES-MACÍAS A, RODRÍGUEZ NAVARRO S, DE LA TORRE MM. 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia* 31: 856-860.

PULIDO-HERRERA, L. A., BETANCOURT, J. A., GRANT, W., & VILCHEZ, S. J. 2015. Distribución inusual y potencial de la garrapata común del ganado, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, en zonas tropicales de alta montaña de los Andes colombianos. *Biota Colombiana*, 16(2).

QUESADA-MORAGA, E., RUIZ-GARCÍA, A., & SANTIAGO-ALVAREZ, C. 2006. Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against puparia and adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, 99(6):1955-1966.

RIVAS ESTEBAN, I. P. 2016. Diseño, desarrollo y evaluación de una formulación de microcápsulas del piretroide cipermetrina

RONDINA, R.V.D. y J.D.1989. Coussio. “Estudio fitoquímico de plantas medicinales argentinas (1)”. Revista de Investigaciones Agropecuarias, INTA. Serie 2, Biología y Producción Vegetal, 6 (22). Buenos Aires.

ROSADO-AGUILAR, J.A.; AGUILAR-CABALLERO, A.; RODRIGUEZ-VIVAZ, R.I.; BORGES- ARGAEZ,R.; GARCIA-VAZQUEZ, Z.; MENDEZ-GONZALEZ, M. 2010. Acaricidal activity of extracts from *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae). *Vet. Parasitol.* 168: 299–303.

RUEDISUELI FL, MANSHIP B . 2006. Tick identification key. University of Lincoln. Available on-line at http://webpages.lincoln.ac.uk/fruedisueli/FRwebpages/parasitology/Ticks/TIK/tick-key/softticks_adult.htm.

RUVALCABA, M. F., PADILLA, A. M. B., VÁZQUEZ, C. C., & VELÁZQUEZ, V. M. H. 2011. Evaluación de cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre la inhibición de oviposición, eclosión y potencial reproductivo en una cepa triple resistente de garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini)(Acari: Ixodidae). *Entomotropica*, 25(3):109-115.

SALAMA, A., HINESTROSA, A. P., & DEL PILAR CHAVEZ, M. 1996. Fito y bioanálisis de algunas plantas utilizadas en medicina popular con posible actividad farmacológica. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, 25(1): 44-51.

SAUERESSIG, T. M. 2005. Control racional de las parasitosis bovinas con bajo impacto ambiental. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, Brasil. Disponible en [http://www.avpa.ula.ve/eventos/xi_seminario/Conferencias/Articulo-1.pdf][consultado 7 de abril de 2016]

SICCO, G.; VENEGAS, L.; MUÑOZ, V. 1965. Informe forestal del Departamento de Caldas. Fondo de Desarrollo y Diversificación de zonas cafeteras. Manizales.p 152

SOARES, S.F.; BORGES, L.M.F.; BRAGA, R.S.; FERREIRA L.L.; LOULY, C.C.B.; TRESVENZOL, L.M.F.; PAULA, J.R. & FERRI, P.H. 2010. Repellent activity of plant-derived compounds against *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) nymphs. *Vet Parasitol*, 167:67–73.

SRIVASTAVA, R.; GHOSH, S.; MANDAL, D.B.; AZHAHIANAMBI, P.; SINGHAL, P.S.; PANDEY, N.N.; *et al.* 2008. Efficacy of *Azadirachta indica* extracts against *Boophilus microplus*. *Parasitol Res*; 104(1):149-53.

SUMANO H, 2006. Farmacología Veterinaria, 3a Ed. México, Editorial L. McGraw Hill Interamericana.(5): 200-220

THO B, 2003. Study on pharmaceutical effects of stemone extracto on animal ectoparasites and clinical trial results. Vet. Assoc. Hanoi,Vietnam. 10 (1): 58-63

TORRES A, RICHIARDI L, NASSIFF A, RICCIARDI A, ARMANDO A, DELLACASSA E, 2005. Examen del aceite esencial de Ambrosia tenuifolia, “altamisa” de San Lorenzo, Corrientes. Universidad Nacional del Nordeste, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Disponible en [<http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/com2005/8-Exactas/E-011.pdf>]. [Consultado el 19 de junio de 2016]

TORRES, J.H., 1983. Contribución al conocimiento de las plantas tanteas registradas en Colombia. Universidad Nacional - Colciencias-Bogotá. 175 p.

TORREY, J.G., 1976. Initlation and development of root nodules of Cassuarlne (Cassuarlnaceae). American Journal of Botany. 63 (3): 335-344.

TREVIÑO MEDINA, R. 2013. *Evaluación de resistencia a ixodicidas y efectividad de la vacuna Bm86 en el grado de infestación por garrapata Boophilus SP. en las razas de ganado bovino charolais, simmental, brangus negro y comercial*(Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).

UNIVEP. 1998. Unidad Nacional de Vigilancia Epidemiológica Veterinaria. Anuario Epidemiológico. Santa Cruz, Bolivia. pp. 9 - 10.

URQUARTH, G.M 1993. Parasitología Veterinaria. Editorial Acribia. Zaragoza, España. P. 276-279 y 287-290.

WU M, 2004. Glossogyne tenuifolia acts to inhibit inflammatory mediator production in a macrophage cell line by downregulating LPSinduced NF-kappa B. In: Journal of Biomedical Science. 11 (2): 186-99.

YÁNEZ, C. 2013. Determinación de la Incidencia de Anaplasmosis y Babesiosis en el ganado bovino sometido a explotación en la parroquia Huigra, cantón Alausí, provincia de Chimborazo. (Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Ambato).

Recuperado de

<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:9fdDoBaNsacJ:repo.uta.edu.ec/bitstre>

[am/handle/123456789/3793/Tesis02Vet..pdf%3Fsequence%3D1+&cd=2&hl=es-419&ct=clnk&gl=ec](http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:9fdDoBaNsacJ:repo.uta.edu.ec/bitstre)

ZARE R. y GAMS W. 2004. A monograph of Verticillium Section Prostrata. Botanical Journal of Iran Rostanika, (3): 1-9